

lung H^2 ,^{10a}. Im Falle des ADM-Adduktes sind **4** und **6** identisch, die Mechanismen der Bildung nicht unterscheidbar. Auch frühere Befunde lassen jedoch an einem zu **5** analogen Entstehen wenig Zweifel.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Photochemische Umwandlungen, 35. Mitteilung. – 34. Mitteilung: *W. Eberbach, P. Würsch & H. Prinzbach*, *Helv. 53* (1970), im Druck.
 [2] *H. Prinzbach, W. Eberbach & G. Philippossian*, *Angew. Chem. 80*, 910 (1968); vgl. auch *S. F. Nelsen & J. P. Gillespie*, *Tetrahedron Letters 1969*, 3259, 5059; *R. S. Liu, ibid. 1969*, 1409.
 [3] *W. Eberbach & H. Prinzbach*, *Helv. 50*, 2490 (1967).
 [4] *H. Prinzbach & J. Rivier*, *Angew. Chem. 79*, 1102 (1967).
 [5] *H. Prinzbach, M. Argüelles, P. Vogel & W. Eberbach*, *Angew. Chem. 79*, 1103 (1967); *P. Deslongchamps & J. Kallos*, *Canad. J. Chemistry 45*, 2235 (1967); *H. Prinzbach, P. Würsch, P. Vogel, W. Tochtermann & C. Franke*, *Helv. 51*, 911 (1968); *H. Prinzbach, R. Fuchs, R. Kitzing & H. Achenbach*, *Angew. Chem. 80*, 699 (1968).
 [6] *H. Prinzbach, G. Philippossian, G. Kaupp & P. Würsch*, in Vorbereitung.

103. Cyclisations par l'intermédiaire de fonctions phénylthio- et phénoxy-carbamoyle

II. Formation d'anhydrides azasucciniques et de leurs produits de polycondensation. Intervention du cation carbamoyle-pyridinium¹⁾

par **P. Baudet, Cl. Otten** et **D. Rao**

Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève

(3 V 69)

Summary. The *N*-(*p*-nitrophenoxy-carbonyl) derivatives of glycine, DL-alanine and DL-leucine are transformed by the action of pyridine into azasuccinic, 3-methyl-2-azasuccinic and 3-isobutyl-2-azasuccinic anhydride, respectively. These cyclisations occur probably via the intermediate *N*-carbamoyl-pyridinium cation -CONH-CHR-COOH, the rate of cyclisation seems to depend on the concentration of the intermediate in the form of the dipolar ion -CONH-CHR-COO⁻, *i.e.* the ionised carboxyl is necessary for the reaction. In γ -collidine the cyclisation occurs very slowly; this is attributed to the slowness due to steric hindrance of the production of *N*-carbamoyl- γ -collidinium cation and its instability.

The azasuccinic anhydrides mentioned polycondense, yielding the corresponding polyglycine, poly-DL-alanine and poly-DL-leucine. This reaction too is catalysed by pyridine; it can also be effected by γ -collidine, but the efficacy of the latter in comparison with pyridine is even less than in the catalysis of the cyclisation described above. *N*-(*p*-nitrophenoxy-carbonyl)-glycine reacts with lysozyme in the presence of pyridine; several glycine residues are introduced into the enzyme molecule, the product being insoluble and poorly active.

Dans les mémoires précédents, nous avons décrit la formation de l'hydantoïne-acétate-3 d'éthyle (**2**) [2] à partir du *N*-(phénylthiocarbonyl)-glycylglycinate d'éthyle (**1**), et celle de dérivés à cycle hexagonal, les diphényl-1,2-alcoyl-5-dioxo-3,6-hexahydrotriazines-1,2,4 **3**, à partir de *N*-[*N*-(phénylthio-carbonyl)DL-aminoacyl]- et de

¹⁾ I, voir [1].

Nous décrivons dans ce mémoire la cyclisation non seulement de la N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (**6**), mais aussi celle des N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-alanine (**7**) et -DL-leucine (**8**). Ces cyclisations exigent que la fonction carboxyle de ces substrats soit fortement nucléophile; or, dans la pyridine seule, le carboxyle est peu ionisé, donc peu réactif. Par contre, en ajoutant de la triéthylamine, on augmente l'ionisation du carboxyle qui, de ce fait, devient très réactif: dans ces conditions, ces trois N-*p*-nitrophénoxy-carbamates se cyclisent complètement en 2 minutes environ en anhydrides, resp. azasuccinique (**11a**), méthyl-3-aza-2-succinique (**11b**) et isobutyl-3-aza-2-succinique (**11c**) (v. Fig. 1 et Schéma 2).

Schéma 2

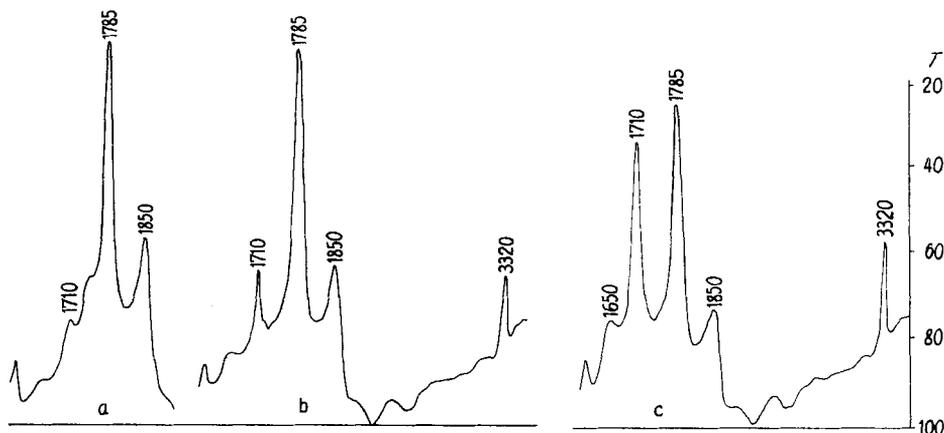
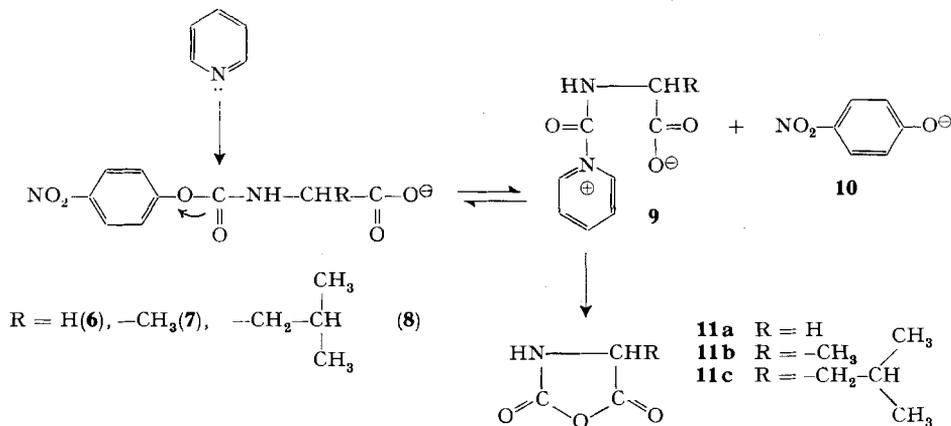


Fig. 1. Spectres IR. de la N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucine (**8**) en solution à 5% dans la pyridine (puriss.), en présence d'un équ. de triéthylamine (puriss.), à température ordinaire
 courbe a: après 2 min, courbe b: après 20 min, courbe c: après 35 min

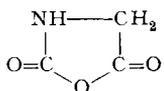
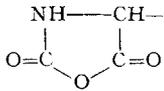
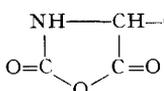
Ces anhydrides azasucciniques subissent dans le milieu de réaction une polycondensation en polyglycine, poly-DL-alanine et poly-DL-leucine resp., à des vitesses décroissant dans cet ordre. Ces polypeptides sont peu solubles dans la pyridine.

Les cyclisations ont été suivies en spectrométrie IR. Les absorptions indiquées dans le tableau I sont caractéristiques des différents substrats et produits, en solution dans la pyridine.

La vitesse de cyclisation est diminuée si la quantité de triéthylamine est abaissée au-dessous de la valeur stoechiométrique; p.ex. avec $1/10$ d'équivalent de triéthylamine, la transformation en anhydride azasucciniques des *N-p*-nitrophénoxy-carbamates en question n'est complète qu'en 30 min environ (fig. 2).

L'étude de ces réactions en spectrométrie d'absorption infrarouge permet de mettre en évidence non seulement les absorptions de produits – anhydrides de *Leuchs* et poly-

Tableau I. Absorptions IR. caractéristiques

Substrat ou produit	Fonction	Absorptions (en cm^{-1})
$p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CONH-CH}_2\text{COOH}$ (6)	C=O carbamate	1740
$p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CONH-CH(CH}_3\text{)-COOH}$ (7)	C=O carbamate	1742
$p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-CONH-CH(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{)-COOH}$ (8)	C=O carbamate	1745
 (11a)	C=O anhydride	1785 1850
 (11b)	C=O anhydride	1785 1850
 (11c)	C=O anhydride	1785 1850
$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-(NH-CH}_2\text{-CO)}_n\text{-NH-CH}_2\text{COOH}$	C=O amide I amide II	1650 1540
$\text{NH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-CO-(NH-CH(CH}_3\text{)-CO)}_n\text{-NH-CH(CH}_3\text{)-COOH}$	C=O amide I amide II	1650 1540
$\text{NH}_2\text{-CH(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{)-CO-(NH-CH(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{)-CO)}_n\text{-NH-CH(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{)-COOH}$	C=O amide I amide II	1665 1540

peptides – mais aussi des bandes d'absorption transitoires révélatrices d'intermédiaires Pour la *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucine en solution dans de la pyridine avec un équivalent de triéthylamine, voilà ce que nous observons: en même temps que disparaît la bande carbonyle du carbamate (1740 cm^{-1}) et qu'augmente l'intensité de celle de l'anhydride isobutyl-3-aza-2-succinique (11c) (1785 et 1850 cm^{-1}), apparaît

une bande d'absorption à 1710 cm^{-1} (v. fig. 1); elle atteint son maximum d'intensité en 60 min, s'atténue et devient très faible après 4 h. Parallèlement, les bandes d'absorption amide I de la poly-DL-leucine (fig. 1) à 1650 cm^{-1} et du CO_2 à 2300 cm^{-1} (dégagé durant la polycondensation) augmentent d'intensité. En présence de seulement $1/10$ équ. de $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, la bande à 1710 cm^{-1} se forme beaucoup plus lentement et demeure plus stable (v. fig. 3). Cette lente évolution va de pair avec la polycondensation, très lente également, de l'anhydride isobutyl-3-aza-2-succinique. L'absorption à 1710 cm^{-1} n'appartient ni aux produits finals ni aux produits de départ; elle est probablement caractéristique d'un intermédiaire de la transformation du N-carboxy-anhydride en poly-DL-leucine. Il est intéressant de constater que cette absorption est fugitive et faible dans les spectres infra-rouges des anhydrides azasuccinique (**11a**) et méthyl-3-aza-2-succinique (**11b**) en voie de polymérisation (v. fig. 2).

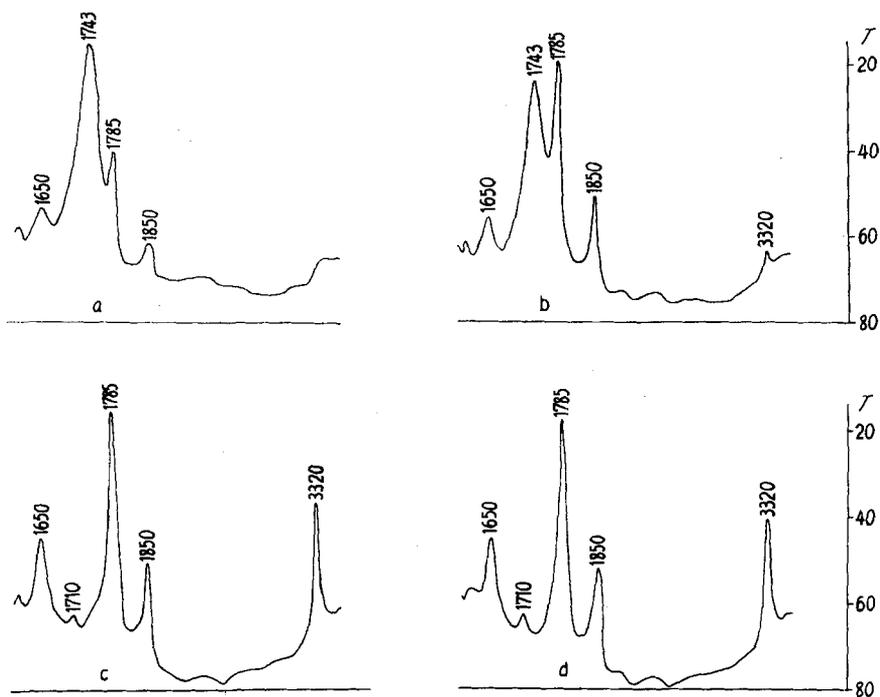


Fig. 2. Spectres IR. de la N-(p-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-alanine (**7**) en solution à 5% dans la pyridine (puriss.), en présence de 0,1 équ. de triéthylamine (puriss.), à température ordinaire courbe a: après 2 min, courbe b: après 15 min, courbe c: après 30 min, courbe d: après 60 min

Nous avons étudié la transformation de la N-(p-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (**6**) dans un solvant non polaire en présence de 1 à 16 équ. de pyridine. Faute d'une solubilité suffisante de ce carbamate dans le benzène ($\epsilon_{20^\circ} = 2,28$), nous avons choisi le CHCl_3 ($\epsilon_{20^\circ} = 4,80$). Toutes les solutions contiennent $1/3$ équ. de $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$. Un blanc contient 16 équ. de pyridine, un autre $1/3$ équ. de triéthylamine. On estime le progrès de la cyclisation de la N-(p-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine en anhydride azasucci-

nique (**11a**) en mesurant, à 350 nm, l'extinction due au *p*-nitrophénol libéré au cours de la réaction. Elle augmente non linéairement avec la concentration de la pyridine (v. tableau II dans la partie expér.); la vitesse de polycondensation de l'anhydride aza-succinique croît dans le même sens. Il faut remarquer cependant que la polyglycine formée, insoluble, adsorbe une quantité notable de *p*-nitrophénol.

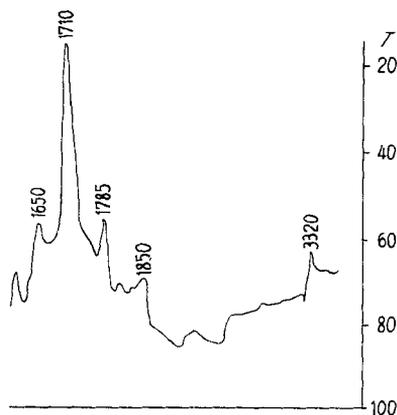


Fig. 3. Spectre IR. de la *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucine (**8**) en solution à 5% dans la pyridine (puriss.), en présence de 0,1 équ. de triéthylamine (puriss.), à température ordinaire, après 240 min

Pour arriver à connaître le mécanisme de ces cyclisations, nous avons pris en considération les propriétés suivantes du carbonyle de la fonction *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl): une polarisation de la liaison du carbonyle à l'oxygène phénoxy

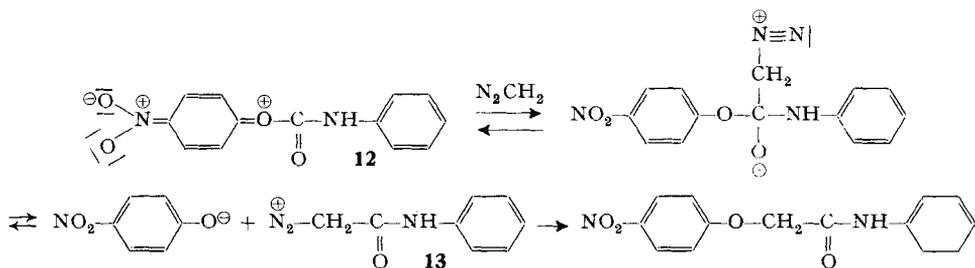
($\text{R}-\overset{\curvearrowright}{\text{O}}-\text{C}-\text{R}'$), induite par un effet de mésomérie dans le reste aromatique, dispose le

carbonyle aux attaques nucléophiles. Nous savons p. ex. [5] que le diazométhane réagit avec la fonction *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl) de la *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-aniline avec insertion, en fournissant le *N*-phényl-*p*-nitrophénoxy-acétamid (anilide de l'acide *O*-(*p*-nitrophényl)-glycolique). Nous admettons [5] que cette insertion est déclenchée par l'attaque nucléophile du diazométhane sur le carbonyle – favorisée par la structure d'un contribuant de résonance **12** – (schéma 3) qui conduit au départ de l'anion *p*-nitrophénolate et à la formation d'un intermédiaire, le cation diazoacétanilide $\text{N} \equiv \overset{+}{\text{N}}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5$ (**13**). Pour la *N*-phénoxy-carbonyl-aniline, où un tel contribuant est négligeable [5], la réaction d'insertion du diazométhane n'a pas lieu. On peut donc admettre que, dans la cyclisation étudiée dans ce mémoire, la pyridine attaque le carbonyle de la fonction *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl) créant le cation carbamoylpyridinium **9** et l'anion *p*-nitrophénolate (**10**) (v. schéma 2).

Nous ne pouvons apporter la preuve directe de l'existence de ce cation: p. ex. aucune bande d'absorption du spectre IR. du *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycinate d'éthyle dans la pyridine ne peut lui être attribuée. Cependant, un argument en faveur de son existence et de sa participation aux cyclisations des acides **6**, **7** et **8** peut être

apporté par le raisonnement suivant : Si nous admettons que l'attaque par la pyridine a lieu sur le carbonyle, provoquant l'hétérolyse de sa liaison avec l'oxygène du reste phénoxy, ce qui fournit le cation N-carbamoylpyridinium **9**, le remplacement de la pyridine par un dérivé de la pyridine à encombrement stérique de l'azote (p.ex. la lutidine-2,6 ou la γ -collidine) devrait ralentir considérablement la cyclisation. Dans ce cas, en effet, 1) l'approche du carbonyle par ces pyridines est gênée, 2) le cation carbamoylpyridinium substitué, non plan, n'est plus stabilisé par résonance. En ap-

Schéma 3



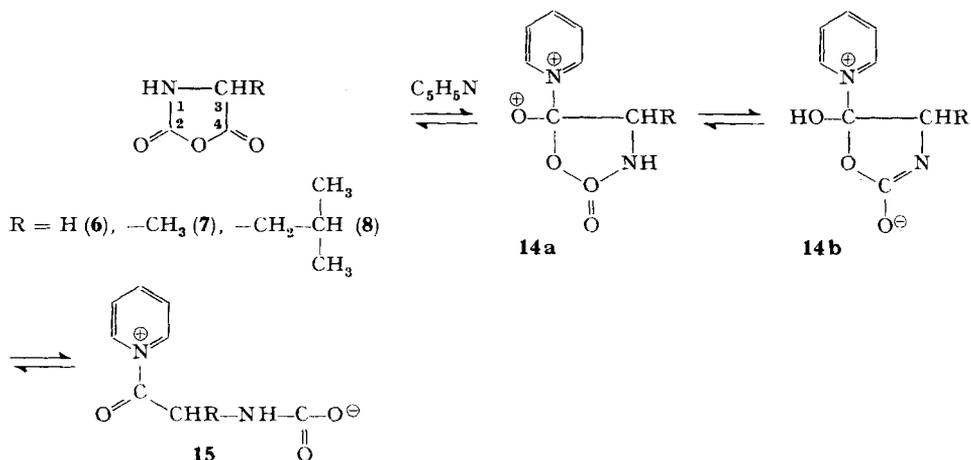
pliquant à ses résultats expérimentaux ces mêmes considérations, *Gold* [6] a apporté des arguments favorables à l'hypothèse de la formation du cation N-acétylpyridinium dans diverses acylations par l'anhydride acétique catalysées par la pyridine. Dans notre cas, nous observons le même effet: le remplacement de la pyridine par la γ -collidine ralentit très fortement la cyclisation des N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-aminoacides en anhydrides azasucciniques: rappelons que dans la pyridine en présence de l'équivalent molaire de triéthylamine, ces réactions sont achevées en 2 min environ; dans la γ -collidine, en présence de la même quantité de triéthylamine, la moitié seulement des carbamates a réagi en 6 h²). Le ralentissement de la réaction provoqué par le remplacement de la pyridine par la γ -collidine est plus marqué encore dans la polycondensation des anhydrides azasucciniques; on peut donc inférer que la pyridine attaque le carbonyle **4** de l'anhydride aza-2-succinique par un mécanisme semblable à celui exposé dans le schéma 2 et produisant un cation acylpyridinium caractéristique d'un zwitterion du type **15** (Schéma 4).

Cette conception rejoint celle de *Wieland* [7]. *Ballard, Bamford & Weymouth* [8] envisagent pour le produit de réaction de la base tertiaire sur le carbonyle **4** de l'anhydride azasuccinique les deux structures **14a** et **14b**. En fait, comme nous l'indiquons dans les équilibres ci-dessus, ces différents zwitterions peuvent exister simultanément.

Nous n'avons encore déterminé ni le poids moléculaire moyen, ni la forme des polypeptides obtenus par les réactions que nous décrivons dans ce mémoire. Selon leurs spectres IR., ces polypeptides se présentent à la fois sous la configuration α (chaînes enroulées) et sous la configuration β (chaînes déroulées). A l'encontre des polyglycine et poly-DL-alanine, la poly-DL-leucine est si peu soluble dans HCl bouillant que son hydrolyse y est extrêmement lente.

²) Nous avons observé un effet tout-à-fait semblable lors de la cyclisation du N-[N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycyl]-N',N'-diphényl-hydrazide en diphényl-1,2-dioxo-3,6-hexahydro-1,2,4-triazine-1,2,4 dans la γ -collidine et la pyridine resp. [1].

Schema 4



Les réactions que nous avons décrites dans ce mémoire permettent d'introduire, dans des conditions particulièrement douces, des acides aminés supplémentaires dans une chaîne polypeptidique ou protéique. Nous avons constaté p.ex. qu'en solution dans un mélange pyridine-eau 2:5, le lysozyme réagit avec l'anhydride azasuccinique formé à partir de la N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine, en additionnant cinq restes de glycine, qui devraient se trouver sur sa fonction α -aminée N-terminale ou encore sur des fonctions ϵ -aminées latérales. Le lysozyme ainsi modifié précipite dans le milieu de réaction: il a perdu 75% de son activité.

Notre gratitude s'adresse au *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* (subside 4862) et à la Maison *Hoffmann-La Roche* à Bâle, qui ont bien voulu soutenir ces travaux.

Partie expérimentale³⁾

1. Méthodes analytiques. – 1.1. Pour les analyses centésimales⁴⁾, les produits sont séchés à 78°/0,05 Torr. Les F. (corrigés) ont été déterminés sur la platine chauffante du microscope de *Kofler*. Les spectres IR. ont été établis avec un spectrophotomètre *Perkin-Elmer 521*.

1.2. Les spectres IR. ont été déterminés, pour les N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine, -DL-alanine et -DL-leucine, avec des solutions à 5% dans de la pyridine *pro analysi* anhydre ou dans une γ -collidine de même qualité (les absorptions du solvant sont compensées), à la température du laboratoire. Pour les trois phénylcarbamates étudiés, et pour les poly-aminoacides formés, on a utilisé des suspensions dans du nujol ou des solutions observées dans des cellules de 50 μ d'épaisseur.

1.3. Dosage du *p*-nitrophénol formé dans des sol. à 1,33% de N-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine dans CHCl_3 *pro analysi* anhydre, en présence de quantités variables de pyridine.

a) *Etalonnage*: A partir de solutions de *p*-nitrophénol *puriss.* de 25 à 200 $\mu\text{g/ml}$ de chloroforme, par lecture de la densité optique à 360 nm. La linéarité entre densité optique (DO.) et concentration est bonne en tous cas jusqu'à 200 $\mu\text{g/ml}$: DO. (25 $\mu\text{g/ml}$) = 0,200; DO. (200 $\mu\text{g/ml}$) = 1,60.

b) *Dosage*: Les solutions à examiner sont diluées à 10 ml par CHCl_3 *puriss.* anhydre; les lectures à 360 nm des DO. sont faites à intervalles choisis (v. tableau I) dans une cellule de quartz de 1 cm d'épaisseur.

³⁾ Les évaporations se font toujours sous pression réduite dans un évaporateur rotatif.

⁴⁾ Exécutées au Lab. de Micro-analyse du Lab. de Chimie Analytique Ecole de Chimie, Université de Genève, par le Dr *K. Eder*.

1.4. *Dosage du lysozyme*: Ce dosage repose sur la mesure de la densité optique à 250 nm, des produits hydrosolubles provenant de la lyse du *Micrococcus lysodeikticus* par le lysozyme. Ce dosage sera décrit ultérieurement [9].

2. Synthèse des carbamates. – 2.1. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (**6**): Préparé selon [2].

2.2. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-alanine (**7**). – 2.2.1. *N*-Carbonyl-DL-alaninate d'éthyle (**7a**). Dans une suspension de 17,5 g (114 mmoles) de HCl-alaninate d'éthyle, dans 300 ml de chloroforme anhydre, portée à reflux, on fait passer du phosgène jusqu'à dissolution complète de l'ester (env. 8 h). Le *N*-carbonyl-DL-alaninate d'éthyle est obtenu par évaporation du solvant: 15 g (91% de la th.). Il est distillé à 42–44°/1 Torr: 12,7 g (86%).

2.2.2. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-alaninate d'éthyle (**7b**). A une solution de 11,7 g (61 mmoles) de **7a** dans 18 ml de chloroforme anhydre on ajoute 11,26 g de *p*-nitrophénol et 4 ml de pyridine. La solution est chauffée 17 h à reflux. Le résidu d'évaporation est cristallisé dans l'éther à –18°: 14 g (61%), F. 85–87°.

$C_{12}H_{14}N_2O_6$ (282,24) Calc. C 51,06 H 4,96 N 9,93% Tr. C 51,29 H 4,91 N 9,99%

2.2.3. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-alanine (**7**). 12 g (42 mmoles) de **7b** sont hydrolysés au bain-marie bouillant dans un mélange de 20 ml de HCl 12N et 20 ml d'acide acétique glacial, durant 1 h. Après évaporation du solvant, l'acide est cristallisé dans 30 ml d'eau, à 4°: 9,0 g (85%), F. 131–133°.

2.3. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucine (**8**). – 2.3.1. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucinate d'éthyle (**8b**).

2.3.1.1. Via le *N*-carbonyl-DL-leucinate d'éthyle (**8a**). Dans une suspension de 9,5 g (48 mmoles) de chlorhydrate de DL-leucinate d'éthyle dans 130 ml de chloroforme anhydre, portée à reflux, on fait passer du phosgène jusqu'à dissolution complète (env. 7 h). Après évaporation du solvant, on distille le liquide résiduel à 43–44°/0,1 Torr: 7,5 g (88,2%).

On porte une solution de 3,55 g (19 mmoles) de **8a** dans 44 ml de chloroforme, contenant 2,78 g (20 mmoles) de *p*-nitrophénol et 1 ml de pyridine, à reflux, 17 h. Après évaporation du solvant, on obtient 6,1 g (93,5%) de **8b** comme huile non cristallisable.

2.3.1.2. Via le chloroformiate de *p*-nitrophényle. A une solution de 9,75 g (50 mmoles) de chlorhydrate de DL-leucinate d'éthyle dans 50 ml de chlorure de méthylène anhydre on ajoute 10,02 g (50 mmoles) de chloroformiate de *p*-nitrophényle. A cette solution, refroidie dans la glace, on ajoute goutte à goutte 13,9 ml (100 mmoles) de triéthylamine dans 50 ml de chlorure de méthylène anhydre. On sort le ballon laboratoire de la glace et 24 h après on évapore le solvant; l'huile résiduelle est reprise dans l'éther. La fraction insoluble est du chlorhydrate de triéthylamine; la fraction soluble (huile), 16,76 g (87%), est le *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucinate d'éthyle (**8b**).

2.3.2. *N*-(*p*-Nitrophénoxy-carbonyl)-DL-leucine (**8**). On dissout 4,60 g (13 mmoles) de **8b** dans un mélange de 40 ml d'acide acétique glacial et 40 ml HCl 12N. Après ébullition à reflux pendant 60 min, le solvant est évaporé, et l'huile résiduelle, extraite par de l'eau. La fraction insoluble est séchée: 3,57 g (85%).

$C_{15}H_{20}N_2O_6$ (324,32) Calc. C 52,02 H 5,40 N 9,46% Tr. C 52,58 H 5,54 N 9,47%

3. Transformation des carbamates en anhydrides azasucciniques et en poly-aminoacides. – 3.1. *Dans la pyridine seule.* Les solutions à 5% des *N*-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (**6**), -DL-alanine (**7**) et -DL-leucine (**8**) dans de la pyridine *puriss.*⁵⁾ (0,008% H₂O) sont examinées entre 4000 et 625 cm⁻¹ après la dissolution (temps = 0) puis après 30, 60 et 180 min, et 22 h.

3.2. *Dans la pyridine en présence de 1 équ. de triéthylamine.* Aux solutions à 5% des carbamates **6**, **7** et **8** dans la pyridine *puriss.* (0,008% H₂O) on ajoute 1 équ. de triéthylamine *puriss.* anhydre. On prend les spectres IR. de ces solutions entre 4000 et 625 cm⁻¹ après 2 min, puis après 20 min, 35 min (fig. 1), 2 h et 4 h. La vitesse de polycondensation de l'anhydride azasuccinique est telle que après 2 min la formation du précipité gélatineux de polyglycine gêne l'introduction de la solution

⁵⁾ Pureté contrôlée en chromatographie en phase gazeuse.

dans la cellule. Il faut tenir l'orifice supérieur de la cellule ouvert pour permettre le dégagement du CO_2 formé lors de la polymérisation des anhydrides de *Leuchs*.

3.3. *Dans de la pyridine contenant $\frac{1}{10}$ équ. de triéthylamine.* Les conditions sont exactement les mêmes que pour 3.2., sauf que la quantité de triéthylamine *puriss.* anhydre introduite dans les solutions est de $\frac{1}{10}$ d'équivalent (fig. 2 et 3).

3.4. *Dans de la γ -collidine contenant 1 équ. de triéthylamine.* Aux solutions à 5% des *p*-nitrophénoxy-carbamates **6**, **7** et **8** dans de la collidine *puriss.* (0,005 H_2O) on ajoute 1 équ. de triéthylamine *puriss.* anhydre. Les prises de spectres entre 4000 et 625 cm^{-1} sont faites immédiatement après les dissolutions, temps = 0, puis après 10, 15, 34, 45, 67 min, et 6 et 15 h.

3.5. *Transformation de la N-(p-nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (6) en anhydride azasuccinique (11a) et en polyglycine dans le chloroforme ($\epsilon_{20^\circ} = 4,80$) en présence de 1 à 16 équ. de pyridine et de $\frac{1}{3}$ équ. de triéthylamine.* On introduit dans chaque tube de deux séries de 7 tubes 10 ml d'une solution à 1,33% de **6** dans le chloroforme *puriss.* anhydre. On ajoute dans un groupe de 5 tubes: au premier 1 équ. (1), au deuxième 2 équ. (2), au troisième 4 équ. (3), au quatrième 8 équ. (4) et au cinquième 16 équ. (5) de pyridine *puriss.* anhydre. Dans tous ces tubes on introduit $\frac{1}{3}$ d'équivalent de triéthylamine. Les sixièmes tubes (6) de chaque série constituent le blanc 1, contenant seulement la solution de **6** et 16 équ. de pyridine, et dans le dernier tube de chaque série on ajoute à la solution seulement $\frac{1}{3}$ équ. de triéthylamine (blanc 2).

Tous les tubes sont portés pendant 72 h dans un thermostat à $25^\circ \pm 0,1^\circ$. Pour le dosage du *p*-nitrophénol apparu (exécuté selon 1.3.), on prélève 0,1 ml de solution qu'on dilue à 10 ml par du chloroforme *puriss.* anhydre. La polyglycine formée dans chacune des séries est isolée par filtration sur un filtre gravimétrique, séchée sous 0,05 Torr et pesée. Le polymère retient par adsorption une quantité non négligeable de *p*-nitrophénol.

Tableau II. *p*-Nitrophénol en solution et polyglycine précipitée, à partir de 0,133 g de **6**

Tube	Equ. de pyridine	Equ. de $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	DO.	mg de <i>p</i> -nitrophénol (% de th.)	mg de polyglycine (% de th.)
1	1	0,3	0,178 0,180	1,1 (1,80)	1 (2,8)
2	2	0,3	0,198 0,200	1,8 (3,0)	1,5 (4,2)
3	4	0,3	0,246 0,250	3,2 (5,3)	2,5 (6,3)
4	8	0,3	0,437 0,430	5,5 (9)	9,1 (25,7)
5	16	0,3	0,615 0,620	8,25 (13,5)	13,6 (38,6)
6	16	–	0,170	0 (0)	0 (0)
7	–	0,3	0,150	0 (0)	0 (0)

4. Identification du chlorhydrate de glycine et de DL-alanine dans les hydrolysats chlorhydriques de la polyglycine et de la poly-DL-alanine. – 10 mg de polypeptide poly-aminoacide sont hydrolysés en tube scellé par 1 ml de HCl 6N à 100° durant 18 h. Ensuite la solution est évaporée, le résidu est repris par de l'eau, qui est évaporée. Les résidus finals sont cristallins. Le spectre IR. (nujol) de l'hydrolysat brut de la polyglycine est identique à celui du chlorhydrate de glycine. Celui de l'hydrolysat brut de la poly-DL-alanine est identique à celui du chlorhydrate de DL-alanine. La solubilité de la poly-DL-leucine dans HCl 6N, même à 100° , est si faible que l'hydrolyse de ce polymère après 18 h de chauffe est négligeable.

5. Introduction de restes de glycine dans le lysozyme. – Dans une solution isoélectrique de 200 mg (0,014 mmole) de lysozyme dans 10 ml d'une solution eau-pyridine (5:2 vol.) on introduit 16,8 mg (0,070 mmole) de *p*-(nitrophénoxy-carbonyl)-glycine (6) et 0,0081 ml de $(C_2H_5)_3N$. Après 10 min, un précipité gélatineux apparaît; après 30 min, la suspension est centrifugée et le résidu, lavé par de l'eau puis séché par lyophilisation; le lyophilisat (202 mg) est peu soluble dans l'eau et ne possède que 25% de l'activité du lysozyme natif. L'examen du surnageant indique que la totalité de la glycine a été incorporée à la protéine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *P. Baudet & M. Calin*, *Helv.* 52, 282 (1969).
- [2] *P. Baudet, M. Calin & E. Cherbuliez*, *Helv.* 48, 2005 (1965).
- [3] *P. Baudet & M. Calin*, non publié.
- [4] *P. Baudet & M. Calin*, *Chimia* 20, 122 (1965).
- [5] *P. Baudet & M. Calin*, *Helv.* 51, 398 (1968).
- [6] *V. Gold & E.G. Jefferson*, *J. chem. Soc.* 1953, 1406.
- [7] *Th. Wieland*, *Angew. Chem.*, 63, 7 (1951).
- [8] *B.D.G.H. Balard, C.H. Bamford & F.J. Weymouth*, *Nature* 174, 173 (1954).
- [9] *P. Baudet*, à publier.

International Symposium on the Chemistry of Nonbenzenoid Aromatic Compounds

(ISNA Japan 1970)

Sendai, August 24th–28th, 1970 (see *Helv.* 52, 1787 (1969))

The 2nd circular with Registration Form, Forms for Submission of a Scientific Paper, for Hotel Accomodation and Tours, Ladies' Program and Post-ISNA Symposia is ready and may be obtained from the ISNA Secretariat c/o Department of Chemistry, Tohoku University, Sendai, Japan (or from Comité Suisse de la Chimie, CH-1211 Conches).
